

09/890841  
JC85 Rec'd PCT/PTO 02 AUG 2001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of:

ALAIN RAMBACH, ET AL.

For: **METHOD FOR DETECTING BACTERIA  
CULTIVATED IN ANAEROBIC CONDITION**

Honorable Commissioner of  
Patents and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

**Request for Priority**

Sir:

Applicant respectfully requests a convention priority for the above-captioned application, namely  
France application number 99/01226 filed February 3, 1999.

☐ A certified copy of the document is being submitted herewith.

Respectfully submitted,

BLAKELY, SOKOLOFF, TAYLOR & ZAFMAN

Dated: 9/2/99

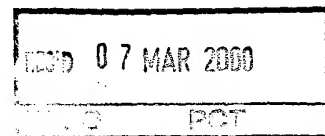
  
Eric S. Hyman, Reg. No. 30,139

12400 Wilshire Blvd., 7th Floor  
Los Angeles, California 90025  
Telephone: (310) 207-3800



FR00/241

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le .....

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30



## BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerja

N° 55 -1328

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

01 FOL 1999

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 01226

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75

DATE DE DÉPÔT

03 FEV. 1999

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉECABINET REGIMBEAU  
26, Avenue Kléber  
75116 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention☐ demande divisionnaire☐ certificat d'utilité☐ transformation d'une demande  
de brevet européen

demande initiale

☐ brevet d'invention☐ certificat d'utilité n°

date

n° du pouvoir permanent

237613 017983 K

références du correspondant

01 45 00 92 02

téléphone

Établissement du rapport de recherche

☐ différé☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Procédé de détection de bactéries cultivées en condition anaérobie

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

RANBACH, Alain

Forme juridique

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

73, Boulevard Montparnasse, 75006 PARIS

Pays

FR

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 01266

TITRE DE L'INVENTION : Procédé de détection de bactéries cultivées en condition anaérobie

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

RAMBACH, Alain  
73, Boulevard Montparnasse, 75006 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

RAMBACH Alain  
73, boulevard Montparnasse  
75006 Paris, FR

FAVIER Christine  
42, rue du Cimetière  
59251 Allennes les Marais, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

3 février 1999

CABINET REGIMBEAU

*[Signature]*  
9901266

## This image appears to be a heavily degraded or corrupted scan of a document page. It features prominent black horizontal bands at the top and bottom, suggesting damage or scanning artifacts. A large, dark, irregular smudge is visible in the center, obscuring any underlying content. The page is covered in numerous small black specks and noise, making it impossible to discern any text or figures.

[illegible]

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

5 La présente invention concerne un milieu de culture de bactéries, à utiliser en condition anaérobie, comprenant au moins un complexe métallique qui permet la polymérisation oxydative d'un dérivé indoxyl. Ledit complexe métallique, en particulier le citrate de fer ammoniacal, à une concentration comprise entre 0,3 et 0,9 mg/l, de préférence 0,6 mg/ml. Le milieu de culture selon l'invention peut comprendre  
10 en outre au moins un substrat contenant un dérivé indoxyl, notamment un substrat tel que X-Gal, à une concentration comprise entre 10 et 500 mg/l.

Des nombreuses méthodes d'identification et de dénombrement de souches bactériennes ont été développées pour satisfaire les besoins en tests ou en outils de  
15 diagnostic dans tous les domaines techniques, et scientifiques qui touchent à la microbiologie, notamment la médecine et l'agro-alimentaire.

De telles méthodes peuvent s'avérer extrêmement utiles pour le diagnostic des infections opportunistes dont les symptômes sont parfois peu caractéristiques de la  
20 cause exacte de la maladie. Par exemple, la maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique du tube digestif. Elle se manifeste par des douleurs abdominales, de la diarrhée, de la fièvre et une dénutrition. Les lésions sont caractérisées par une atteinte de la paroi digestive qui est enflammée, épaissie et ulcérée. Cette maladie dure toute la vie, durant laquelle les patients subissent des  
25 poussées évolutives suivies de périodes de rémission.

Les travaux consacrés aux modifications de la flore au cours de la MC ont donné des résultats discordants. Cependant, la plupart d'entre eux s'accordent pour conclure à une augmentation du nombre d'*E. coli* et de *Bacteroides* du groupe *fragilis*. Aucune  
30 souche potentiellement pathogène n'a pu être individualisée.

L'étude d'une glycoprotéine plasmatique excrétée dans les selles, l' $\alpha$ -1-protéinase inhibiteur, a mis en évidence une altération du métabolisme bactérien chez les patients atteints de MC. En effet, chez les sujets sains, cette glycoprotéine est déglycosylée tout  
 5 le long du colon suite à l'action des exoglycosidases d'origine bactérienne. Par contre, chez les patients, elle reste glycosylée, ce qui traduit un défaut d'activité de ces osidases. Ce défaut a été effectivement prouvé par des dosages d'activités glycosidasiques au sein d'extraits fécaux. Les activités enzymatiques, et notamment celle de la  $\beta$ -galactosidase, ont été trouvées fortement diminuées chez les patients par  
 10 rapport aux témoins, Favier et al., (1996), *Differentiation and identification of human fecal anaerobic bacteria producing  $\beta$ -galactosidase (a new methodology)*, *Journal of Microbiological Methods* 27, 25-31 ; Favier et al., (1997), *Fecal  $\beta$ -D-galactosidase Production and Bifidobacteria Are Decreased in Crohn's Disease*, *Digestive Diseases and Sciences*, 42, 817-822.

15 La capacité de la flore fécale de ces patients et de sujets sains, incubée dans des conditions appropriées, à produire et à libérer la  $\beta$ -galactosidase, a été étudiée. Pour ce faire, des échantillons fécaux sont cultivés, en atmosphère anaérobie et à 37°C, dans un bouillon Wilkins Chalgren (WC) additionné de mucines gastriques de porc (afin de  
 20 favoriser la croissance des germes et la production d'exoglycosidases). L'activité  $\beta$ -galactosidase est dosée sur les surnageants d'aliquotes prélevés en début (2h) et fin (22h) d'incubation.

Ainsi, une méthodologie permettant de dénombrer sélectivement les germes anaérobies libérant la  $\beta$ -galactosidase dans les fèces a été développée. Cependant, compte tenu de  
 25 la complexité de la flore, les méthodes, traditionnellement utilisées, qui consistent à isoler les colonies, identifier les germes, puis doser l'activité enzymatique qu'ils produisent, ne semblent pas susceptibles de répondre au problème posé.

Récemment, l'utilisation de substrats chromogènes, tels que le 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside ou X-gal, a permis la détection des germes anaérobies Lac<sup>+</sup>. Suite à l'hydrolyse enzymatique, le substrat subit une polymérisation oxydative qui provoque la formation d'un précipité bleu. Cette méthodologie, qui permet de  
 5 différencier, directement sur boîte de Pétri, les germes capables de libérer la  $\beta$ -gal dans le milieu, a été appliquée à l'étude des germes fécaux de patients et de sujets sains. Les résultats obtenus ont été rapprochés de ceux tirés de l'analyse, à l'aide de milieux sélectifs, des principaux groupes de germes connus pour leur capacité à produire la  $\beta$ -galactosidase : *Bacteroides*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

10 Des exemples de tels milieux sont présentés dans Chevalier, P., Roy, D. and Savoie, L., (1991) X-Gal based medium for simultaneous enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria in milk, J. Microbiol, Methods 13, 75-83 ; et dans Livingston SJ, Kominos SD, Lee RB, (1978), New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group, J. Clin, Microbiol 7, 448-453.

15 Toutefois, il est parfois difficile de visualiser les bactéries. On a mis au point, dans le cadre de la présente invention, un milieu contenant un complexe métallique oxydant qui permet notamment d'intensifier les halos de couleurs obtenus autour des colonies. Ce perfectionnement de la technique évoquée ci-dessus, a été effectué de façon à  
 20 favoriser la réaction oxydative du substrat dans le milieu réduit nécessaire à la croissance des bactéries en condition anaérobie.

Ainsi, aucun document de l'art antérieur ne décrit, ni ne suggère la présente invention telle que définie ci-après.

25

## DESCRIPTION

La présente invention concerne un milieu de culture de bactéries, à utiliser en condition anaérobie, comprenant au moins un complexe métallique qui permet la  
 30 polymérisation oxydative d'un dérivé indoxyl. Ledit complexe métallique, en



particulier le citrate de fer ammoniacal, a une concentration comprise entre 0,3 et 0,9 mg/l, de préférence 0,6 mg/ml. Le milieu de culture selon l'invention peut comprendre en outre au moins un substrat contenant un dérivé indoxyl, notamment un substrat sélectionné parmi X-Gal, X-Phos, X-acglmn, Mag-Gal, Mag- $\alpha$ -Gal, et Mag-Phos, de préférence X-Gal, à une concentration comprise entre 10 et 500 mg/l, particulièrement entre 50 et 200 mg/l, de préférence à 100 mg/ml.

On entend par « bactérie » dans le cadre de l'invention, les bactéries anaérobies, aérobie anaérobies, et de toute bactérie produisant naturellement ou non une  $\beta$ -galatosidase. Parmi les bactéries transformées, on peut citer notamment une bactérie transformée par un plasmide contenant le gène LacZ, éventuellement sous le contrôle d'un promoteur d'intérêt.

Dès lors, le milieu selon l'invention est destiné à la détection des bactéries anaérobies, aérobie anaérobies, et de toute bactérie produisant une  $\beta$ -galatosidase.

On peut citer comme exemple les bactéries du genre *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Escherichia*, et/ou *Bacteroides*, en particulier des souches *Bifidobacterium bifidum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum*, *E. coli*, et/ou *Bacteroides fragilis*.

De préférence, ce milieu de culture comprend le milieu Columbia cystéiné bien connu de l'homme du métier, dont les ingrédients et les caractéristiques sont les suivants (en base qsp selon le fabricant) :

Glucose	5 g
25 Chlorhydrate de cystéine	0,3 g
Agar	5 g
Eau	1000 ml
pH	7,3
Autoclavage	15 mm, 120°C

30

Néanmoins, le milieu selon l'invention ne se limite pas à une liste d'ingrédients particuliers, de sorte qu'il peut être adapté à la culture d'une bactérie donnée que l'on cherche à détecter. Par exemple, le milieu TSC, décrit ci-dessous, peut servir de base pour la préparation du milieu selon l'invention.

5 Milieu TSC (base qsp selon le fabricant):

Tryptose	15 g
Peptone de farine de soja	5 g
Extrait de levure	5 g
Disulfite de sodium	1 g
10 Agar-agar	15 g
Eau	1000 ml

Le milieu de culture selon l'invention peut contenir en outre du sulfate de magnésium à une concentration comprise entre 5 mM et 100 mM, de préférence 20 mM, et/ou au moins un antibiotique, par exemple la cyclosérine de préférence à 0,4 g/l, la néomycine additionnée de polymyxine de préférence à 0.02 g/l et 0,05 g/l respectivement.

Un aspect complémentaire de la présente invention concerne un produit de combinaison comprenant au moins un complexe métallique oxydant et au moins un substrat contenant un dérivé indoxyl pour une utilisation simultanée, séparée, ou étalée dans le temps, destiné à la détection de bactéries. Ledit substrat peut-être sélectionné parmi X-Gal, X-Phos, X-acglmn, Mag-Gal, Mag- $\alpha$ -Gal, et Mag-Phos, de préférence X-Gal, et ledit complexe métallique est le citrate de fer ammoniacal.

Ce produit de combinaison est caractérisé en ce que le complexe métallique et le substrat sont véhiculés dans un solvant aqueux à une concentration comprises entre 3 et 900 mg/l, de préférence à 60 mg/ml, ou un solvant organique à une concentration comprises entre 100mg/l et 50 g/l, particulièrement entre 500 mg/l et 20 g/l, de préférence à 10 g/l. Le produit de combinaison selon l'invention peut contenir en outre du sulfate de magnésium à une concentration comprise entre 50 mM et 10 M, de préférence 2 M, et/ou au moins un antibiotique.

Un aspect avantageux de la présente invention a pour objet une trousse de détection de bactéries comprenant un produit de combinaison tel que défini ci-dessus.

5 Dans le cadre de l'invention, on entend par « détection » la visualisation, éventuellement l'identification, et la quantification des bactéries.

La présente invention porte également sur un procédé de détection de bactéries caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 10 a) On ajoute à un milieu susceptible de contenir lesdites bactéries, cultivées en condition anaérobie, au moins un substrat contenant un dérivé indoxyl,
- b) on ajoute au moins un complexe métallique oxydant, en particulier le citrate de fer ammoniacal,
- c) on visualise l'apparition d'un précipité de couleur autour des colonies (halo) et/ou une coloration des colonies.

15

Dans un autre mode de réalisation le procédé de détection de bactéries comporte les étapes suivantes :

- a) On cultive lesdites bactéries dans un milieu selon l'invention en condition anaérobie,
  - 20 b) on visualise l'apparition d'un précipité de couleur autour des colonies (halo) et/ou une coloration des colonies ;
- ou encore les étapes suivantes :
- a) On ajoute à un milieu, susceptible de contenir lesdites bactéries cultivées en condition anaérobie, un produit de combinaison selon l'invention,
  - 25 b) on visualise l'apparition d'un précipité de couleur autour des colonies (halo) et/ou une coloration des colonies.

Un aspect supplémentaire de la présente invention concerne l'utilisation d'un complexe métallique oxydant, de préférence le citrate de fer ammoniacal, pour  
30 catalyser la polymérisation oxydative de dérivés indoxyl conduisant à un composé

coloré insoluble, notamment pour améliorer la détection de la libération d'un dérivé indoxyl par un enzyme à partir d'un substrat contenant un dérivé indoxyl, ledit substrat pouvant être un substrat sélectionné parmi X-Gal, X-Phos, X-acglmn, Mag-Gal, Mag- $\alpha$ -Gal, et Mag-Phos, de préférence X-Gal. Ledit complexe métallique permet  
5 d'intensifier le halo de couleur et/ou pour augmenter la coloration des colonies.

L'invention porte également sur l'utilisation d'un milieu, d'un produit de combinaison ou d'un kit tels que décrits ci-dessus pour la détection des bactéries qui possèdent un enzyme permettant la libération d'un dérivé indoxyl à partir d'un substrat contenant un dérivé indoxyl.

10

L'ajout du citrate de fer ammoniacal permet non seulement de visualiser des couleurs qui n'apparaissent pas en culture dans des jarres en condition anaérobie, mais également d'intensifier le halo de couleurs des colonies cultivées sous sachet plastique en condition anaérobie. Le milieu columbia semble tout à fait avantageux pour  
15 l'apparition des couleurs. Bien entendu, les couleurs et l'intensité des couleurs obtenues dépendent étroitement des souches, du niveau d'expression et de sécrétion de la  $\beta$ -galactosidase.

Les exemples ci-après sont donnés afin d'illustrer la présente invention mais ils n'en  
20 limitent pas les modalités d'exécution.

#### **EXEMPLE 1 : MILIEU DESTINE A LA DETECTION DES BIFIDOBACTERIES**

25 La capacité du citrate de fer ammoniacal (FAC) à augmenter la formation de l'indigo en sachet Generbag Anaer® et en jarre a été déterminée.

Une souche de *Bifidobacterium bifidum* a étéensemencée sur le milieu Columbia cystéiné + X-Gal avec ou sans FAC (0.3 g/l), puis on a testé l'effet de l'ajout du FAC  
30 avant ou après autoclavage/régénération.

Les colonies dans le sachet Generbag Anaer® sont entourées par un halo plus intense en présence de FAC, et les halos sont devenus visibles en jarre.

- Le dénombrement bactérien montre une diminution du nombre de germes quand le  
5 FAC est ajouté au milieu après autoclavage/régénération.

Ainsi, le FAC, ajouté avant régénération du flacon, favorise l'apparition du halo.

- Différentes concentrations de FAC ont ensuite été testées sur trois souches de  
10 *Bifidobacterium*. Les résultats sont présentés au tableau I ci-dessous

Tableau I

FAC (g/l)	0	0.3	0.6	0.9
<i>B. bifidum</i>	Ø	+	++	+++ ↓
<i>B. longum</i>	Ø	+	++	++
<i>B. dentium</i>	Ø	+	++	++

Ø : sans halo

- 15 + ->+++ : intensité du halo

↓ : diminution du nombre de germe (ici de 90 %)

En conséquence, 0.6 g/l de FAC semble être une concentration idéale pour visualiser la présence de halo autour des colonies *Bifidobacterium* après culture dans une jarre.

20

## EXEMPLE 2 : ETUDE DE DIFFERENTS SUBSTRATS POUR FAIRE APPARAÎTRE LA COLORATION EN ANAEROBIOSE PAR AJOUT DU FAC.

- On a testé différents substrats (100 mg/l) en milieu Columbia cystéiné, en présence et  
25 en absence de FAC (0.6 g/l)

### 2.1 Milieu additionné de X-Gal

La présence de FAC a permis d'observer la coloration due à l'hydrolyse du substrat X-Gal pour les colonies de *Clostridium* :

Les colonies de *C. perfringens* ( $\beta$ -galactosidase+) sont ocre sans FAC ; bleu-vert avec un halo bleu en présence de FAC. Les colonies de *C. butyricum* ( $\beta$ -galactosidase+) sont crèmes sans FAC ; crème-verdâtre entourées d'un léger halo bleu vert avec le FAC. Par contre, les colonies de *Citrobacter* ( $\beta$ -galactosidase+) restent crèmes avec ou sans FAC : soit le FAC ne suffit pas pour voir la coloration, soit les germes n'ont pas hydrolysé le substrat. Dans cette souche le gène LacZ est sans doute sous le contrôle de l'opéron lactose. Dès lors, il est nécessaire d'ajouter du lactose dans le milieu de culture pour induire l'expression de la  $\beta$ -galactosidase.

Les différences entre le milieu avec FAC et le milieu sans FAC sont particulièrement importantes pour les souches de *C. perfringens*, et *C. butyricum*.

## 2.2 Milieu additionné de Mag-Gal

Les colonies de *C. perfringens* ( $\beta$ -galactosidase+) sont ocre sans FAC ; roses avec un halo rose en présence de FAC.

Les colonies de *C. butyricum* ( $\beta$ -galactosidase+) sont crèmes sans FAC ; rosées avec un halo rose avec le FAC, et celles de *Citrobacter* ( $\beta$ -galactosidase+) sont crèmes sans FAC ; rosées avec le FAC. La présence de FAC a permis d'observer la coloration due à l'hydrolyse du substrat Mag-Gal pour les colonies de *Clostridium butyricum* et pour les *Citrobacter*. Les enzymes de ces derniers ne seraient donc pas inductibles mais seraient plus capables d'hydrolyser le Mag-Gal que le X-Gal.

Les différences entre le milieu avec FAC et le milieu sans FAC sont, dans l'ordre, très marquées pour la souche de : *C. perfringens*, *C. butyricum*, *Citrobacter*.

## 2.3 Milieu additionné de X-Phos

Les colonies de *C. perfringens* (phosphatase alcaline+) sont crèmes sans FAC ; crème verdâtre avec un léger halo bleu en présence de FAC.

Les colonies de *C. butyricum* (phosphatase alcaline-) sont crèmes sans FAC ; crèmes avec un halo très clair près de la colonie puis bleu en périphérie avec le FAC, et celles de *Citrobacter* sont crèmes sans FAC ; bleu-vert avec un léger halo bleu-vert avec le FAC.

- 5 Les colonies de *E. coli* sont crèmes verdâtre très clair sans FAC et plus foncées avec le FAC. Enfin, celles de *Bacteroides fragilis* (phosphatase alcaline+) sont crèmes quand elles sont isolées, bleues en groupe sans FAC ; crème foncé, marron clair avec FAC.

- 10 Les différences entre le milieu avec FAC et le milieu sans FAC sont très marquées pour la souche de : *Citrobacter*, viennent ensuite dans l'ordre : *C. butyricum*, *C. perfringens*, *E. coli* et, enfin *B. fragilis*. Même si les couleurs ne sont pas nettes, la présence de FAC a permis d'observer la coloration (*C. perfringens*, *C. butyricum*), ou d'accroître la couleur (*E. coli*) due à l'hydrolyse du substrat X-Phos. En ce qui concerne *B. fragilis*, cette libère des enzymes extra cellulaires qui forment des halos de  
15 couleurs indéfinissables.

#### 2.4 Milieu additionné de Mag-Phos

- 20 Les colonies de *C. perfringens* (phosphatase alcaline+) sont crèmes sans FAC ; roses avec un halo rosé en présence de FAC. Celles de *C. butyricum* (phosphatase alcaline-) sont crèmes sans FAC ; roses avec un halo rosé avec le FAC. Celles de *Citrobacter* sont crèmes (centre plus foncé) sans FAC ; roses (géluse rosée) avec le FAC.

- 25 Celles de *E. coli* sont crèmes (centre plus foncé) sans FAC ; roses (géluse rosée) avec le FAC. Celle de *Bacteroides fragilis* sont rosé-crème sans FAC ; rosé-crème avec un halo brunâtre avec FAC.

La présence de FAC a permis d'observer la coloration due à l'hydrolyse du substrat Mag-Phos pour les colonies de *Clostridium*, les *E. coli* et les *Citrobacter*.

Les différences entre le milieu avec FAC et le milieu sans FAC sont plus marquées pour les souches de : *C. perfringens* et *C. butyricum*, viennent ensuite *Citrobacter* et *E. coli*, enfin *B. fragilis*.

## 5 2.5 Milieu additionné de Mag- $\alpha$ -Gal

Les colonies de *C. perfringens* (Mag- $\alpha$ -Gal+) sont crèmes sans FAC ; rosées en présence de FAC. Celles de *Bacteroides fragilis* (Mag- $\alpha$ -Gal+) sont crème foncé sans FAC ; rosé-crème avec FAC. Celles de *C. butyricum* (Mag- $\alpha$ -Gal+), *Citrobacter*, et *E. coli* sont crèmes sans FAC ; crèmes plus ou moins foncées avec le FAC.

Les différences entre le milieu avec FAC et le milieu sans FAC sont plus marquées pour les souches de : *C. perfringens* et *B. fragilis*, viennent ensuite *C. butyricum*, *Citrobacter* et *E. coli*.

## 15 2.6 Milieu additionné de X-acglmn.

Les colonies de *C. perfringens* (X-acglmn+) sont crèmes sans FAC ; crèmes très légèrement verdâtre en présence de FAC. Celles de *C. butyricum* (X-acglmn-) n'ont pas poussé sans FAC ; verdâtres avec un halo bleu en présence de FAC. *Bacteroides fragilis* (X-acglmn+), *Citrobacter* et *E. coli* sont crèmes avec ou sans FAC.

Les différences entre le milieu avec FAC et le milieu sans FAC sont plus marquées pour les souches de : *C. perfringens*.

En conclusion, il ressort de ces études que les colorations sont apparues en milieu additionné de FAC, pour la majorité des colonies. Le *C. butyricum* donne des résultats contredisant ses activités enzymatiques supposées ; toutefois, la souche utilisée n'est pas forcément représentative de l'espèce.

## EXEMPLE 3 : EXPERIENCES EN MILIEU TSC « NORMAL »



Pour être plus proche des milieux sélectifs permettant les dénombrements des *Clostridii*, on a réalisé une première étude en milieu de base TSC « normal » avec le disulfite et le FAC (1.0 g/l), et sans antibiotique.

- 5 Les colonies de *Clostridium perfringens* sont noires. Que l'on ajoute du X-Gal, du Mag-Phos, du X-glu ou du X-glucu, les colorations dues à l'hydrolyse de ces substrats restent difficiles à voir. Cependant, les halos gris-bleu autour des colonies de *C. perfringens* en présence de X-Gal (100 mg/l, associé au Mag-Phos 50 m/l ou au X-glucu 100 m/l) peuvent permettre de distinguer les *C. perfringens* des autres germes.
- 10 Ces halos sont observés également autour des colonies toutes bleues d'*E. coli* (uniquement en X-Gal+ Mag-Phos).

Ainsi, l'apparition de la coloration est gênée par l'utilisation du disulfites par les *C. perfringens*. Il semble nécessaire de travailler dans un milieu sans disulfite.

15

#### EXEMPLE 4 : EXPERIENCES EN MILEU TSC SANS DISULFITE

- Reprenant la base du milieu TSC (milieu TSC sans antibiotique, et cette fois sans disulfite), on a testé les substrats X-Gal, Mag-Gal, X-Phos et Mag-Phos (100 mg/l) en
- 20 présence et en absence de FAC (0.6 g/l). Les colorations sont, en général, moins nettes qu'en milieu Columbia.

- Avec X-Gal, les différences entre le milieu avec FAC et le milieu sans FAC sont plus marquées pour les souches de : *C. perfringens* et *E. coli*, puis *Citrobacter* et *B. fragilis*.
- 25 *C. butyricum* reste crème avec FAC.

Avec Mag-Gal, les différences entre le milieu avec FAC et le milieu sans FAC sont plus marquées pour la souche de : *C. perfringens* puis pour celles de *E. coli* et *Citrobacter*, et enfin *B. fragilis*. *C. butyricum* n'a pas poussé en absence de FAC.

30

Avec X-Phos les différences entre le milieu avec FAC et le milieu sans FAC sont plus marquées pour la souche de : *E. coli*, *Citrobacter* puis celles de *C. perfringens* et *B. fragilis*. *C. butyricum* n'a pas poussé en absence de FAC.

- 5 Avec Mag-Phos les colonies sont juste plus foncées en présence de FAC, les différences entre le milieu avec FAC et le milieu sans FAC sont plus marquées que les souches de *E. coli* et *Citrobacter* puis pour celle de *C. perfringens*.

- 10 En conclusion, il est préférable d'utiliser le milieu Columbia cystéiné pour faire apparaître une couleur plus intense comparé au milieu TSC.

Si on donne une valeur pour l'intensité des couleurs des colonies en fonction du substrat, la  $\beta$ -galactosidase semble permettre de visualiser d'avantage les *C. perfringens* par rapport à la phosphatase (Voir tableau II ci-dessous)

15

Tableau II

	<i>C. perfringens</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. fragilis</i>
X-Gal	3	2	0	Ø	Ø
X-Gal TSC	3	0	2	3	2
Mag-Gal	3	2	1	Ø	Ø
Mag-Gal TSC	3	Ø	2	2	1
<b>GALACTOSIDASE</b>	<b>3</b>	<b>1.33</b>	<b>1.25</b>	<b>2.5</b>	<b>1.5</b>
X-Phos	2	2	3	2	1
X-Phos TSC	2	Ø	3	3	2
Mag-Phos	3	3	2	2	1
Mag-Phos TSC	2	0	3	3	0
<b>PHOSPHATASE</b>	<b>2.25</b>	<b>1.66</b>	<b>2.75</b>	<b>2.5</b>	<b>1</b>

Ø : manque de données

- 20 3 à 0 : intensité relative de la couleur des colonies pour un milieu donné avec un substrat donné

**EXEMPLE 5 : ETUDE DE L'EFFICACITE DE L'AJOUT DES FERRI-CYANIDES POUR FAIRE APPARAÎTRE LA COLORATION EN ANAEROBIOSE**

- 5 On a utilisé le ferri cyanide seul à 0.6 g/l. Il n'y a aucune différence entre les milieux contenant ou non ce produits pour le substrat X-Gal.

Seules les colonies de *Bacteroides fragilis* sont bleues avec le X-Phos en présence de ferri cyanide.

- 10 Ainsi, le X-Phos + ferri cyanide peut être un excellent milieu pour pré-identifier les *Bacteroides*.

**EXEMPLE 6 : AMELIORATION DU MILIEU DESTINE A L'ETUDE DES CLOSTRIDIUM PAR AJOUT D'ANTIBIOTIQUES**

15

Pour se rapprocher du milieu TSC sélectionnant les *C. perfringens*, on a ajouté des antibiotiques à la base TSC :

- soit de la cyclosérine (0.4 g/l) ;
- soit de la néomycine additionnée de polymyxine (0.02 et 0.05 g/l respectivement) ;
- 20 - soit les trois ensemble.

Toutes les colonies (*C. perfringens*, *C. butyricum*, *E. coli*, *B. fragilis*, *Citrobacter*) poussent en présence de cyclosérine seule. Par contre, l'association néomycine et polymyxine (0.02 g/l et 0.05 g/l) permet d'inhiber la croissance de *B. fragilis*, *E. coli* et

25 *Citrobacter*.

Les deux souches suivantes de *Clostridium* poussent :

- les colonies de *C. butyricum* restent crèmes,

- celles de *C. perfringens* sont légèrement colorée (colonies au centre rosé avec Mag-Gal (100 mg/l) et FAC (0.6 g/l) et colonies au centre verdâtre entourées d'un très léger halo avec X-Gal (100 mg/l) et FAC (0.6 g/l)).

- 5 En milieu Columbia cystéiné, les couleurs devraient être plus foncées et l'addition d'antibiotiques, qui possèdent le grand avantage d'être autoclavables, devrait permettre d'inhiber les autres germes.

- 10 La croissance des *C. butyricum* n'est pas gênante en milieu TSC étant donné que les colonies restent crèmes, mais sera gênante en milieu Columbia car les colonies ont des colorations proches de celles des *C. perfringens*.

### REVENDICATIONS

1. Milieu de culture de bactéries, à utiliser en condition anaérobie, comprenant au moins un complexe métallique qui permet la polymérisation oxydative d'un dérivé indoxyl.
2. Milieu de culture selon la revendication 1 dans lequel ledit complexe métallique à une concentration comprise entre 0,3 et 0,9 mg/l, de préférence 0,6 mg/ml.
3. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 et 2 dans lequel ledit complexe métallique est le citrate de fer ammoniacal.
4. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3 comprenant en outre au moins un substrat contenant un dérivé indoxyl.
5. Milieu de culture selon la revendication 4 dans lequel ledit substrat est sélectionné parmi X-Gal, X-Phos, X-acglmn, Mag-Gal, Mag- $\alpha$ -Gal, et Mag-Phos, de préférence X-Gal.
6. Milieu de culture selon la revendication 5 dans lequel ledit substrat a une concentration comprise entre 10 et 500 mg/l, particulièrement entre 50 et 200 mg/l, de préférence à 100 mg/ml.
7. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il est destiné à la détection des bactéries anaérobies, aérobie anaérobies, et de toute bactérie produisant une  $\beta$ -galatosidase.
8. Milieu de culture selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il est destiné à la culture des bactéries du genre *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Escherichia*, et/ou *Bacteroides*, en particulier des souches *Bifidobacterium bifidum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum*, *E. coli*, et/ou *Bacteroides fragilis*.
9. Milieu de culture selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il comprend le milieu Columbia cystéiné.
10. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé en ce qu'il comporte en outre du sulfate de magnésium à une concentration comprise entre 5 mM et 100 mM, de préférence 20 mM, et/ou au moins un antibiotique.

11. Produit de combinaison comprenant au moins un complexe métallique oxydant et au moins un substrat contenant un dérivé indoxyl pour une utilisation simultanée, séparée, ou étalée dans le temps, destiné à la détection de bactéries.
- 5 12. Produit de combinaison selon la revendication 11 caractérisé en ce que ledit substrat est sélectionné parmi X-Gal, X-Phos, X-acglmn, Mag-Gal, Mag- $\alpha$ -Gal, et Mag-Phos, de préférence X-Gal.
13. Produit de combinaison selon l'une des revendications 11 et 12 caractérisé en ce que ledit complexe métallique est le citrate de fer ammoniacal.
- 10 14. Produit de combinaison selon l'une des revendications 11 à 13 caractérisé en ce que ledit complexe métallique et ledit substrat sont véhiculés dans un solvant aqueux à une concentration comprises entre 3 et 900 mg/l, de préférence à 60 mg/ml, ou un solvant organique à une concentration comprises entre 100mg/l et 50 g/l, particulièrement entre 500 mg/l et 20 g/l, de préférence à 10 g/l.
- 15 15. Produit de combinaison selon l'une des revendications 11 à 14 caractérisé en ce qu'il comporte en outre du sulfate de magnésium à une concentration comprise entre 50 mM et 10 M, de préférence 2 M, et/ou au moins un antibiotique.
16. Trousse de détection de bactéries comprenant un produit de combinaison selon l'une des revendications 11 à 15.
- 20 17. Procédé de détection de bactéries caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :
  - a) on ajoute à un milieu susceptible de contenir lesdites bactéries, cultivées en condition anaérobie, au moins un substrat contenant un dérivé indoxyl,
  - b) on ajoute au moins un complexe métallique oxydant, en particulier le citrate de fer ammoniacal,
  - 25 c) on visualise l'apparition d'un précipité de couleur autour des colonies (halo) et/ou une coloration des colonies.
18. Procédé de détection de bactéries caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :
  - a) on cultive lesdites bactéries dans un milieu selon l'une des revendications 1 à 10 en condition anaérobie,
  - 30 b) on visualise l'apparition d'un précipité de couleur autour des colonies (halo) et/ou une coloration des colonies.

19. Procédé de détection des bactéries caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- a) on ajoute à un milieu, susceptible de contenir lesdites bactéries cultivées en condition anaérobie, un produit de combinaison selon l'une des revendications 11 à 16,
- b) on visualise l'apparition d'un précipité de couleur autour des colonies (halo) et/ou une coloration des colonies.

20. Utilisation d'un complexe métallique oxydant pour catalyser la polymérisation oxydative de dérivés indoxyl conduisant à un composé coloré insoluble.

21. Utilisation selon la revendication 20 pour améliorer la détection de la libération d'un dérivé indoxyl par un enzyme à partir d'un substrat contenant un dérivé indoxyl, ledit substrat pouvant être un substrat sélectionné parmi X-Gal, X-Phos, X-acglmn, Mag-Gal, Mag- $\alpha$ -Gal, et Mag-Phos, de préférence X-Gal.

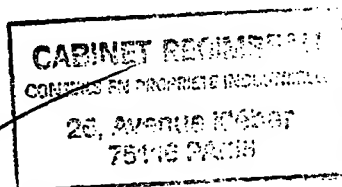
22. Utilisation selon la revendication 21 pour intensifier le halo de couleur et/ou pour augmenter la coloration des colonies.

23. Utilisation selon l'une des revendications 20 à 22 caractérisé en ce que le complexe métallique oxydant est le citrate de fer ammoniacal.

24. Utilisation d'un milieu selon l'une des revendications 1 à 10 pour la détection des bactéries qui possèdent un enzyme permettant la libération d'un dérivé indoxyl à partir d'un substrat contenant un dérivé indoxyl.

25. Utilisation d'un produit de combinaison selon l'une des revendications 11 à 16 pour la détection des bactéries qui possèdent un enzyme permettant la libération d'un dérivé indoxyl à partir d'un substrat contenant un dérivé indoxyl.

ORIGINAL



19. Procédé de détection des bactéries caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 5 a) on ajoute à un milieu, susceptible de contenir lesdites bactéries cultivées en condition anaérobie, un produit de combinaison selon l'une des revendications 11 à 15,
- b) on visualise l'apparition d'un précipité de couleur autour des colonies (halo) et/ou une coloration des colonies.

20. Utilisation d'un complexe métallique oxydant pour catalyser la polymérisation oxydative de dérivés indoxyl conduisant à un composé coloré insoluble.

- 10 21. Utilisation selon la revendication 20 pour améliorer la détection de la libération d'un dérivé indoxyl par un enzyme à partir d'un substrat contenant un dérivé indoxyl, ledit substrat pouvant être un substrat sélectionné parmi X-Gal, X-Phos, X-acglmn, Mag-Gal, Mag- $\alpha$ -Gal, et Mag-Phos, de préférence X-Gal.

15 22. Utilisation selon la revendication 21 pour intensifier le halo de couleur et/ou pour augmenter la coloration des colonies.

23. Utilisation selon l'une des revendications 20 à 22 caractérisé en ce que le complexe métallique oxydant est le citrate de fer ammoniacal.

20 24. Utilisation d'un milieu selon l'une des revendications 1 à 10 pour la détection des bactéries qui possèdent un enzyme permettant la libération d'un dérivé indoxyl à partir d'un substrat contenant un dérivé indoxyl.

25 25. Utilisation d'un produit de combinaison selon l'une des revendications 11 à 16 pour la détection des bactéries qui possèdent un enzyme permettant la libération d'un dérivé indoxyl à partir d'un substrat contenant un dérivé indoxyl.

30

30



